

CT

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-500580

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)1月19日

(51)Int.Cl.  
A 61 K 38/00識別記号  
A D P

8314-4C

F I

A 61 K 37/02

A D P

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平5-504766  
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)9月9日  
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)3月9日  
 (86)国際出願番号 PCT/AU92/00480  
 (87)国際公開番号 WO93/04690  
 (87)国際公開日 平成5年(1993)3月18日  
 (31)優先権主張番号 PK8279  
 (32)優先日 1991年9月9日  
 (33)優先権主張国 オーストラリア(AU)  
 (81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
 D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M  
 C, N L, S E), A U, C A, J P, U S

(71)出願人 ベブチド テクノロジイ リミテッド  
 オーストラリア国 2099 ニュー サウス  
 ウエールズ ディー ホワイ インマン  
 ロード 4-10  
 (71)出願人 キングス カレッジ ロンドン  
 イギリス国 WC2R 2LS ロンドン  
 ザ ストランド (番地なし)  
 (72)発明者 ミカエリス, ジューゲン  
 オーストラリア国 2118 ニュー サウス  
 ウエールズ カーリングフォード ホニ  
 トン アヴェニュ イースト 10  
 (74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖尿病の合併症及び病因の処理方法

(57)【要約】

本発明は糖尿病の合併症と病因との治療のための方法を提供する。この方法は ( $\beta$ -A<sub>1</sub>a-His)<sub>n</sub>、(Lys-His)<sub>n</sub>、式R<sub>1</sub>-X-R<sub>2</sub>の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る媒体、ここでnは2-5であり、R<sub>1</sub>は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファーアミノが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、R<sub>2</sub>は1又は2の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーカルボキシルが1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及びXはR<sub>3</sub>-L又はD-His(R<sub>4</sub>)-R<sub>5</sub>であり、ここでR<sub>3</sub>は空位か又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のω-アミノアシルであり、R<sub>4</sub>は空位又はアルキル-スルフィドリル、ヒドロキシル、ハログン及び/又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、R<sub>5</sub>は空位又は1から12炭素原子、好適には2から6炭素原子のカルボキシ(アルキル)アミドである、よりなる群から選択された化合物

を備えた組成物の糖尿病患者への投与を包含する。好ましくはその化合物はカルノシンである。

## 請求の範囲

1. ( $\beta$ -Ala-His)n、(Lys-His)n、式  $R_1-X-R_2$  の化合物、質量上許容し得るそれらの塩基とそれらの組み合せ；及び質量上許容し得る酸性、ここでこれは 2-5 であり、 $R_1$  は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファーアミノが 1 から 12 塩基原子、好適には 2 から 6 塩基原子のアルキル又はアルカルキルによってアセチル化され、 $R_2$  は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーカルボキシルが 1 から 12 塩基原子のアルキル又はアルカルキルによってアセチル化又はアミド化され、及び X は  $R_3-L$  又は  $D-His(R_4)-R_5$  であり、ここで  $R_3$  は空位か又は 1 から 12 塩基原子、好適には 2 から 6 塩基原子の  $\omega$ -アミノアシルであり、 $R_4$  は空位又はアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による導荷イミダゾールであり、 $R_5$  は空位又は 1 から 12 塩基原子、好適には 2 から 6 塩基原子のカルボキシ（アルキル）アミドである、よりなる群から選択された化合物を複数個を医療者に投与することを備えた糖尿病患者における合併症と糖尿病の病因の治療方法。
2. 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の方法。
3. 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第 2 項記載の方法。
4.  $R_1$  と  $R_2$  が L-又は D-リジン又は L-又は D-アスパラギン酸又は L-又は D-グルタミン酸又はそれらの組合物であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の方法。
5. 前記組成物がさらにアミノグアニジンを備えることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 4 項のうちいずれか 1 項記載の方法。
6. 前記組成物がインシュリンスルホニル尿素、ビグアニジン及び／又はアミリン尿素とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 5 項のうちいずれか 1 項記載の方法。
7. 前記組成物が注射、注入、吸収、吸入、点眼、イオン導入法又は局所付加によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。
13. 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項記載の使用。
14. 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第 1-3 項記載の使用。
15.  $R_1$  と  $R_2$  が L-又は D-リジン又は L-又は D-アスパラギン酸又は L-又は D-グルタミン酸又はそれらの組合物であることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項記載の使用。
16. 前記薬がさらにアミノグアニジンを備えることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-5 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
17. 前記薬がインシュリンスルホニル尿素、ビグアニジン及び／又はアミリン尿素とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-6 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
18. 前記薬が注射、注入、吸収、吸入、点眼、イオン導入法又は局所付加によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-7 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
19. 前記薬が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-8 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
20. 前記化合物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収／吸着、皮膚透作及び／又は皮膚刺激に備しては改善されたような分子であるところの別な分子と組合され又は結合されたものである請求の範囲第 1-2 項から第 1-9 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
21. 前記分子が、ラクリル硫酸ナトリウム、ラクリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラクリルエトキシレート、オクタノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合せよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 2-0 項記載の使用。
22. 前記化合物が医療前庭体の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 2-1 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 8 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

8. 前記組成物が経口的又は点眼的に投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

9. 前記組成物及び、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収／吸着、皮膚透作及び／又は皮膚刺激に備しては改善されたような分子であるところの別な分子と組合され又は結合されたものである請求の範囲第 1 項から第 7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

10. 前記分子が、ラクリル硫酸ナトリウム、ラクリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラクリルエトキシレート、オクタノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合せよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 9 項記載の方法。

11. 前記化合物が医療前庭体の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 10 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

12. 糖尿病の合併症と病因の治療のための薬の製造において、( $\beta$ -Ala-His)n、(Lys-His)n、式  $R_1-X-R_2$  の化合物、質量上許容し得るそれらの塩基とそれらの組み合せ；及び質量上許容し得る酸性、ここでこれは 2-5 であり、 $R_1$  は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーアミノが 1 から 12 塩基原子、好適には 2 から 6 塩基原子のアルキル又はアルカルキルによってアセチル化され、 $R_2$  は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーカルボキシルが 1 から 12 塩基原子、好適には 2 から 6 塩基原子のアルキル又はアルカルキルによってエステル化又はアミド化され、及び X は  $R_3-L$  又は  $D-His(R_4)-R_5$  であり、ここで  $R_3$  は空位か又は 1 から 12 塩基原子の  $\omega$ -アミノアシルであり、 $R_4$  は空位又はアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による導荷イミダゾールであり、 $R_5$  は空位又は 1 から 12 塩基原子、好適には 2 から 6 塩基原子のカルボキシ（アルキル）アミドである、よりなる群から選択された化合物の使用。

## 明細書

## 糖尿病の合併症及び病因の治療方法

本明は、糖尿病の合併症と病因の治療方法に関する。

ジペプチドであるカルノシンは、肉から得られる熱安定性椎体として、約 90 年前に発見された (Gulevitsch と Akiradzibbi, 1990)。以来これら初期の原産地については、ジペプチドの分布と代謝に関する多くのデータが蓄積された。カルノシン ( $\beta$ -アラニル-L-ヒスチジン)、及びアンセリン ( $\beta$ -アラニル-L-メチル-L-ヒスチジン) やホモカルノシン ( $\alpha$ -アミノ-L-チリル-L-ヒスチジン) のよう、その構成化合物は、多数の哺乳動物の骨骼筋肉 (2-20 mM) や脳 (0.3-5 mM) を含む組織に、ミリモル濃度で存在している。ジペプチドのこの外の、生理学的機能を説明するための一見された仮説は存在していないが、それらの抗糖化特性、致時糖尿病からの DNA の保護能力、二価カルチオンのキレート能、生理的 pH 値での強烈な緩衝能力から、それらのインビポでの主要な機能が、タンパク質、糖質及び他の巨大分子を保護するものであるとの提案がなされた。

自由ラジカル消滅作用としての機能に付け加えて、カルノシンは「免疫調節作用」として作用し (Nagai (Nagai) 特許: GB 214372A)、それは、ある種の癌治療に有効な性質を持つことが主張されている (Nagai, 特許 DE 3424781A1)。カルノシンは、過酸化脂質に誘起された白内障の治療にも有効であることが示された (Bavithayev, 1989)。また、カルノシンは、外傷の治癒速度を促進できるという証拠もある。

## 生化学的グリコシレーション (glycosylation)

自由ラジカル障害は、タンパク質及び核酸の構造に作用する唯一の過程ではない。非酵素的グリコシレーション (グリケーション (glycation)) である、食物化学におけるメイラード反応 (メイラード、1912) または褐色反応は、アミノ基と醣アルデヒドまたはケト基との反応を含み、それは変性アミノ基を生成し、結果グリコシレーションが進行した最終生成物 (advanced-glycosylation-end-pr-

ucts) (AGE-生成物) を形成する。インビポでのグリケーションは高いが、根本的に重要なのは、老いること、及び細胞レベルが上昇する、即ち糖尿病という病理学的状況である。

タンパク質のグリケーションは試験管の中で実施することができる。いくつかの研究により、ほとんどのタンパク質とDNAが、非酵素的グリコシレーショントンの潜在的ターゲットであり、そこでは、糖が分子のアミノ基に、シップ塩基を通して結合し始めるということが示された。引続き再配列が起こり、着色された生成物を与える(アマドリ生成物と呼ばれる)。さらに、アマドリ生成物の還元側定されていない反応が起こる。

タンパク質中の好みのグリケーション部位の分析により、リジン残基のアミノ基が、特にヒスチジン残基に近接しているとき、主要な目標になることが示された(ShiltonとWellon, 1991)。インビポでの長い半減期を持つ安定なペプチドの探索において、カルノシンのアミノ酸配列がシトローハミュに類似しており、糖と反応し、アルデヒド化合物として反応する能力を有しているを見いたした。さらに、カルノシンは実質的に非毒性であり、よく証明された毒性試験によれば、その材料は哺乳類に5-10g/kg体重1kgのレベルまで投与することができ、長期間の治療にわたって毒性副作用は予想されないことを示した。

その他の二つの化合物だけが、糖と反応し、アマドリ再配列を遮断することにより、グリケーションを還元化することが示された。アミノグアニジンは、インビポとインビトロの両方で、グルコース取りのグリケーションが進行した糖生成物を減少させる。不幸にも求核的ヒドログラジンであるアミノグアニジンは、非生理的であり、知られていない長期の毒性がある。

#### 糖尿病

糖尿病は、インシュリンの急性または慢性欠乏に起因する代謝上の疾患である。これは、血糖グルコースレベルの上昇によって診断される。急性状態は、インシュリン依存性細胞のグルコース取り込みの減少によって特徴づけられる。生体は、その結果生ずる脂肪分解の増加とグリコーゲン合成の減少によるエネルギー欠乏を中和する。糖尿病の病状が進展あるとき、熱量は2つの主要な源から失われ

な効果を有していると思われる。

#### グリケーションとアテローム性動脈硬化症

最近の研究により、AGEがアテローム性動脈硬化症の進行において影響を有しているかもしれないことが示唆されている。これは、ヒトの尿球が、その表面にAGE特異的レセプターを有しており、リリーシング(relaxing)シトキンによって刺激されたとき活性するという発見に基づいている。血管壁に対する小さな斑斑は、サブ-内皮AGEに晒し、半胱の保護を促進し、アテローム性動脈硬化症の進行を開始する。発揮しているリボタンパクもまたグリケーションを受け、それは、グリケーションされていないリボタンパクより早い速度で内皮細胞によって取り込まれる。これは、糖尿病において重要であり、グリケーションされたリボタンパクの血清レベルの上昇が報告されている。従って、カルノシンのような抗グリケーション特性を有する化合物は、血管の疾患に積極的な効果を持つ。

糖尿病性合併症の理由は充分に理解されていないので、系統的な治癒状況を更けるために必要なグルコース濃度の変化に応じて、皮下注射後にインシュリンを速効的に放出することは、適切ではないかもしれない。従って、糖尿病の血糖レベルは、平均して非华人より高く、それはグリケーションのレベルの増加をもたらす。最もよい例は、グリコヘモクロビンであり、それは糖尿病グルコースレベルに比例した量が赤血球中で非酵素的に形成する。グリケーションされたヘモグロビンと血清アルブミンの割合が高いことは、糖尿病の治癒率の度合の監視に用いられる。

血糖中の高いグルコースレベルの長期にわたる影響を中和する化合物の、制御された血糖の採取を、アミリン選択性での、インシュリン皮下、スルホニル尿素とビグアニド(bioguanide)薬理学的効用のようない剂群された糖尿病治療に付け加えることは有用であろう。グリケーションに参加するのは、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リボース及びデオキシリボースのような多元糖の固有形態だけである。この自由アルデヒド基を捕捉し、それを非毒性形態に結合させることにより、インビポ及びインビトロでの高い糖レベルに起因する傷害を減少できるものと信じている。合併症と病理の治療のために提案された化合物は、以下の特典のうち

ある。即ち、グルコースは便で失われ、体タンパク質もまた失われる。これは、インシュリンが使用する筋肉から再利用されるアミノ酸からの蛋白新生が不十分だからである。急性の肉毒は、インシュリン注射によって弱解できるが、その制劑は決して完全にはできないので、糖尿病の長期にわたる遷移は、生後後期に、目(白内障発生や網膜疾患)、腎臓(腎臓病)、神経(神経炎)、及び血管(血管床やアテローム性動脈硬化症(atherosclerosis))において起こる合併症に依存する。冠状心疾患は、糖尿病及び非糖尿病も同様に、最も一般的な死因であることは充分はされている。

皮タンパクの分析は、糖尿病患者の重大な腎臓疾患(腎臓病)の存在を検定するために通常要求される。皮タンパク結果が正であることは、一過性または直見でない皮膚癌の発見であるかもしれないし、あるいは腎臓障害の初期段階であるかもしれない。最も重大なタンパク質は、腎臓病群、ハイバーテンション、及び進行している腎臓障害と関連している。これらの条件下では、腎糸球体は、タンパク質の透過性が上昇するが、その機構はあまり解明されていない。その影響は、全腎臓障害をむしろ急速に促進させ、最終的に死に至らしめるので非常に重大である。このタンパク質の生成は、糖尿病、頭痛性眩暈症、紅斑性狼瘡のような疾患の二次的病態として起こる。

糖尿病の他の合併症として、糖尿病の流行におけるグリケーションの潜在的役割を考慮に入れなければならない。被膜毛細管は、毛細管内腔を沿って並び、透達性(血清-組織)隔壁を形成する内皮細胞、及び周皮細胞(隔壁細胞)を含んでおり、それらは、その2つの隔壁タイプにより生成される基底膜で包まれている。糖尿病性網膜疾患の初期段階において、壁間皮細胞は選択的に失われ、基底膜を取り囲んだゴーストのような質を放散する。血清-網膜隔壁の破壊は、もうひとつの放散である。アルドース還元酵素阻害剤が、動物の実験的糖尿病疾患の治療において研究されている。それらの作用の機構は、ソルビトールの蓄積と、結果としての透達性の変化を説明することである。しかし、ハメス(Hemes et al.) (1991)が、アミノグアニジンが実験的糖尿病性網膜疾患の進行を阻害することを示したという事実から、非酵素的グリコシレーショントンとの結合が明らかになった。カルノシンのような他の潜在的なグリケーション阻害剤も積極的に

のひとつまたはそれ以上を有するペプチドである。

- 1) 比較的高い投与量においても非毒性であること。
- 2) 体内の非特異的プロテアーゼによって降解されず、完全に血清または器官に吸収されること。しかし、胃酸によってクリアされ、それによって糖尿病のグルコースとして血漿の濃度に分布されること。
- 3) そのペプチドは、タンパク質表面のアミノ基に比較して、蛋白質と強く反応すること。
- 4) 短期的にグリケーションしたペプチドは、グリケーションしたアミノ酸とは逆に、突然変異性とならないこと。
- 5) そのペプチドが血清または組織中の特異的プロテアーゼにより降解したならば、結果的なアミノ酸は、糖尿病の重症度がある。例えば蛋白新生を促進したり良い蛋白質を中和したりすること。

#### 発明の範囲

本発明からは、カルノシンと類似の活性を持つペプチドは、糖尿病の合併症及び病因の処理に有効であると信じる。

従って、第1の発明において、本発明は、糖尿病の合併症及び病因の処理方法である。その処理方法では、糖尿病患者へ(β-Ala-His)n、(Lys-n-His)n、一般式R<sub>1</sub>-X-R<sub>2</sub>の化合物、それらの異性体上昇される場合、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる化合物と、製造上昇されるキャリアからなる組合せを複数する。ここで、nは2-5、R<sub>1</sub>は1または2の天然発生(natural occurring)アミノ酸で、異性体1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでエステル化されたα-カルボキシルを有していてよい。R<sub>2</sub>は1または2の天然発生アミノ酸で、異性体1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでアセチル化されたα-アミノ酸を有していてよい。また、XはR<sub>3</sub>-またはD-His(R<sub>4</sub>)-R<sub>5</sub>であって、R<sub>3</sub>は空位または異性体1から12、好ましくは2から6のω-アミノアシルである。R<sub>4</sub>は空位またはアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ酸で置換されたイミダゾールであり、R<sub>5</sub>は空位または異性体1から1

2. 好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

第2の單位において、本発明は、 $(\beta-\text{Ala}-\text{His})_n$ 、 $(\text{Lys}-\text{His})_n$ 、一般式 $R_1-X-R_2$ の化合物、それらの製造上許容される場、及びそれらの組合せからなる構から選ばれた化合物の、糖尿病の合併症及び病因の治療用医薬の合成における用途である。ここで、 $n$ は2-5、 $R_1$ は1または2の天然性アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアルキルでエステル化されたオーカルボキシルを有していてもよい。 $R_2$ は1または2の天然性アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアルキルでアセチル化されたオーアミノを有していてもよい。また、 $X$ は $R_3$ -1または $D-\text{His}(R_4)-R_5$ であって、 $R_3$ は空位または炭素数1から12、好ましくは2から6の $\omega$ -アミノアシルである。 $R_4$ は空位またはアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハログン及び/またはアミノ基で導かれたイミダゾールであり、 $R_5$ はボイドまたは炭素数1から12、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

本発明の好ましい実施形態では、 $R_1$ 及び $R_2$ は、1-またはD-リジンあるいはL-1またはD-アスパラギン酸あるいはL-1またはD-グルタミン酸あるいはこれらの組合せである。本発明の好ましい実施形態では、その化合物はカルノシン、アンセリン、オフィジン、ボモカルノシン、ボモアンセリン、D-カルノシン、及びカルニシンからなる構から選ばれ、最も好適には、化合物はカルノシンである。

本発明のさらに好ましい実施形態では、その組成物は、アミノグアニジンのような、糖尿病の合併症及び病因の治療に有効な効果を有する他の化合物を含む。

さらに、多くの治療されるべき疾患が、インシュリンスルホニル尿素、ビグアニド、またはアミリン遮断治療を受けていてもよく、本発明の組成物は、そのインシュリンスルホニル尿素、ビグアニド、またはアミリン遮断治療と共に投与してもよい。

スルホニル尿素類ビグアニド治療についてのさらなる情報は、ベックニールセン(Beck-Nielsen)の“Pharmacology of Diabetes”、C.E.RogensenとC.Stanleyの、1991、pp75-92、そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

上で述べたように、その組成物は注剤によって投与してもよい。例えば、無菌の注射可能な水性もしくは油性懸濁液のような注射可能な薬剤は、通常の分散または溶解剤及び乳化剤を使用して、当量をよく知られた方法に従って製造できる。その無菌の注射可能な薬剤は、非吸水性外経口に許容されるうる希釈剤または溶媒中の、無菌注射可能な溶媒または懸濁液でもよい。使用してよい液体及び溶媒は、水、リソングル液、及び生理食塩水である。さらに、無菌の固定油(fixed oil)は、麻油または毛用油として、從来通り使用することができる。この目的のために、合成モノノレグリセリドを含む任意の種やかな固定油を用いてよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能な薬剤で使用できることがわかった。

その組成物の投与すべき日毎の全投与量は、治療されるべきホスト及び、特に投与方法に依存するだろう。ある特定の患者への特定の投与量レベルは、採用されたその特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康、性、食餌、投与時間、投与経路、併用薬、及び患者が受けうる副作用の重さを含む要因の変化に依存することは理解できるであろう。必要とされる投与量レベルの選択は、この分野の熟達した者の専門的技術の範囲内であると思われる。

カルノシンの投与量は、2.0mgから2g/体重kg/日であり、好ましくは100mgから2000mg/体重kg/日であろうと思われる。

上で述べたように、糖尿病に関連した合併症のひとつは白内障である。従って、本発明の組成物の投与の特に好ましい形態は、点滴である。この状況において、製造上許容されるキャリアは、無菌の水性または非水性溶媒、懸濁液、乳化液、及び飲食である。点滴に適した製造上許容される液体の例は、プロピレンジコール及び、製造上許容されるアルコール、ゴマまたはピーナッツ油及び他の製造上許容される油、石油ゼリー、メチセルロース、カルボキシメチセルロース塩、ヒドロキシエチセルロース、ヒドロキシプロビルセルロースのような水溶性の油に許容される非毒性ポリマー、ポリアクリル酸塩、アクリル酸エチル、ポリアクリルアミドのようなアクリレート、ゼラチン、アルギメント、ベクチンのような天然物、酢酸デンプン、ヒドロキシエチルデンプンエーテル、ヒドロキシプロビルデンプンのようなデンプン誘導体、同様に、ポリビニルアルコール、ポ

リゴン病におけるアミリンプロテーカー治療の使用についてのさらなる情報は、ウェスター・マーク(Westermark et al.) 1987、DNAS、84、3881-3885、そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

インシュリン治療の大さな欠点のうちのひとつは、注射を継続して必要とする事である。本発明は、カルノシンと、ビグアニドまたはスルホニル尿素との経口投与による他の方法を提供でき、それは糖尿病に対してより効果的である。

本発明の組成物は、注射、注入、採取、吸入イオン透析療法、または局部塗布のような任意の方法で投与することができる。しかし現時点では、経口で投与するのが好ましい。

さらに好ましい具体例では、活性化合物は、粗筋物の皮膚透通、皮膚空隙、組織吸収/吸着、皮膚透通、及び/または皮膚創傷を改善するような他の分子と組合または結合している。その分子は、ラクリル酸ナトリウム、ラクリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラクリルエトキシレート、エタノール及びそれらの混合物からなる群から選ばれるのが好ましい。

その化合物は、蛋白前駆体(prodrug)の形態であってもよい。プロドラッグ技術のさらなる情報は、「医薬品デザインと発達のテキストブック(A Text Book of Drug Design and Development)」、ボブル・クロックスガードーラーセンとハンス・ブンドガード(Poul Eriksen-Larsen and Hans Bundgaard)編、5章「プロドラッグのデザインと応用(Design and Application of Prodrugs)」、H.ブンドガードに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロス・リファレンス(cross-reference)として含まれている。

上で述べたように、本発明の組成物は経口投与されるのが好ましい。当量には理解されるように、その組成物を経口デリバリー(delivery)への適合性を改善するような多くの修飾をなすことができる。経口デリバリーのさらなる情報は、「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリー(Peptide and Protein Drug Delivery)」、ビンセント H. L. リー(Vincent H.L. Lee)編、16章「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリーの経口経路(Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery)」、V. H. L. リーらに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロス・リファレンスとして含まれている。

リビニルビロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレノキシド、カルボポール(carbopol)及びキサンタンガムのような合成高分子、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、緩衝剤、保存剤、潤滑剤、乳化分散剤のような修飾を含んでいてもよい。好ましい保存剤は、四級アンモニウム化合物、フェニル水酸塩、ベンジルアルコール、フタル酸エタノールなどの防腐剤、及びメタビスルフィドナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ポレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点での組成物はソリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

これまでの知識で明らかのように、糖尿病の合併症及び病原は、非酵素的グリコシレーションを減少または防することによって処理できる。従って、本発明の方法は、非酵素的グリコシレーションによる他の疾患状態の、他の有害な合併症及び病原の治療に有効であることが予想できる。

本発明の性質がより明確に理解されるために、好ましい形態を、以下の実験例及び図面を参照して説明する。

第1図は、L-カルノシンと糖との反応濃度を示す。L-カルノシン(60mM)は、pH 7の50mMナトリウム-リシン酸緩衝液中で、5時間60°Cで、糖(180mM)と反応させ、カルノシンの自由アミノ基の減少を、HPLCによって検定した。SEM(培養液中の全カルノシンの±1%)

第2図は、カルノシンのアセトーム性酵素活性に対する影響を示す。(黒コレステロール、ロコレステロール+カルノシン)

第3図は、糖尿病ラットにおける白内障の形成に対するカルノシンの影響を示す。(糖尿病、四肢糖尿病、ロコレスチア+カルノシン)。

#### 発明の詳細な説明

##### 方法

##### 糖に対するペプチドとアミノ酸誘導体との反応

別の方法を除き、反応は、60°Cの水浴中、密封されたミクロ透心分離用バイアルの中、リン酸塩で緩衝化された培養液、PBS、(140mlのNaCl/

特表平7-500580 (5)

10 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.4)で行われる。反応混合物は、50 mMのペプチドと、500 mMの糖を含む。指定条件の時間のポイント毎にサンプルが取られ、水で1:20に希釈され、HPLCによる分析の時は-20°Cで貯えられる。

#### アミノ基の検出

ペプチドの末端アミノ基の検出のためには、ウォーターズオート、(Waters AUTO) OPA<sup>TM</sup>が使用される(Waters AUTO, TAG<sup>TM</sup>機も使用)。簡単に言うと、ペプチドは、オーフタルアルdehyドと反応され、蛍光性の化合物が、溶媒として15分間にわたって10%から90% (各回/回収) のメタノールの割合を用いたラジカル-PACK<sup>TM</sup>C18カラム上のHPLCにより分離される。励起340 nm/反射440 nmのウォータース470蛍光検出セット(Waters 470 fluorescence detector set)が使用される。

グリコアセチル化蛋白質(Glycated Proteins)のHPLC特性のアルカリ性クロマトグラフィー:

カラム スパロース6 (Superose 6), ファーマシア (Pharmacia)

試料： 蛋白質の試料 (約100 μg) の100 μL

溶離液: 10 mMのリン酸緩衝液pH 7.3, 8, 140 mMのNaCl, 2 mMのKCl, 0.02%のNaN<sub>3</sub>, 0.05%のツィーン (Tween) 20

流速 (FLOW RATE): 0.5 mL/min

検出: 280 nm

校正はファーマシア (Pharmacia) の高分子量 (HMW) と低分子量 (LMW) との校正キットを用いて成される。

校正成分	分子量	保持時間	
HMW ブルーデキストラン	>2,000,000	15.49	n=5
チログロブリン	669,000	25.84	n=6
フェリタン	440,000	29.73	n=5
カタラーゼ	232,000	32.58	n=6
アルドラーゼ	158,000 共通	32.58	n=6

リー (Kaiser's Glycerol Jelly) が販賣される。障害が起きた部分は、直接的に、菌糸分析 (アイコン (Eye com) 850菌糸プロセッサー) を用い、菌糸部分を直接走査する。コンピューターを用いた菌糸測定は、影響を受けた領域のパーセンテージを内面的に決定するのに用いられる。アテローム性動脈硬化症のデーターの代表的な部分は、光学顕微鏡法による菌糸のために、取り除かれる。結果は、±均±SEMとして表される。

#### 菌糸のネズミの中の白内障の形成

200-250 gの重さで、玉径6週間の雌のスプレイダウケイ (Sprague-Dawley) ネズミは、次の三つの処理グループ: コントロール、糖尿病、カルノシンで処理された糖尿病のネズミを無作為に使用した。糖尿病は、ストレプトゾチシン (streptozotocin) STZ (くえん強酸塗料、pH 4.5中、体の重量に対して60 mg/kg) で引き起こさせ、一週間後、20 mM以上の血糖のグルコースのレベルを持つ全ての動物が研究に含まれる。糖尿病のネズミは、治療されてないもの、または、飲料水中に2%のカルノシンを受けたものが無作為化される。

#### 結果

##### 菌糸剤上

#### 菌とカルノシンの反応

グリケーション (glycation) 中のアルdehydoとアミノ基との間の反応度は、単に濃度だけでなく、反応の濃度にも依存し、このように、平衡の影響を受けない反応の速度を上げるために、生体外での実験中、非生理的な条件の使用が示される。メイラーと反応の中の最初のステップは、アルdehydoと一次のアミノ基の間のシップ塩基の形成であり、他の直鎖状の鎖の形の量にしたがって変化する。これはアマドリキニと複雑な二次反応による結果として起こり、多くは十分に理解されていない。

グルコース、ガラクトース、カルノシンを持つジドロキシアセトン (dihydronoxactetone (DHA)) のインキュベーションは、メイラード (1912) により最初に述べられたように、グリケーションの特色として茶色の変化を生ずる。菌とカルノシンの反応は、HPLC後に、蛍光定量的に測定された過酸アミノ基の消失をもたらす。グルコース、ガラクトース、DHAは、それらとカルノシ

L MW ブルーデキストラン	>2,000,000	15.65	n=5
アルブミン	67,000	33.74	n=6
オボアルブミン	43,000	35.57	n=5
キモトリプシンA	25,000	39.23	n=6
リボヌクレアーゼA	13,700 共通	39.23	n=6

#### 蛋白質の表面異常性の測定の分析 “エイルズ試験”

グリケートした化合物の半胱が、キム (Kim) ら (1991) にしたがって成される。簡単に言えば、D-グルコース (1 M) と、次のそれぞれ: L-カルノシン、L-アラニン、L-アラニン (全て1 M) とが蒸留水中に溶解され、pHが7に調整され、混合物が100°Cで80分間加熱される。温度 (50 mM) と250 mMは、標準的なキモトリプシンのミクロソーム (S-9) の半胱による代謝活性を用い、または、用いずに、プレート法 (Karon and Ames, 1983) を使用するネズミ肝臓の *Salmonella typhimurium* TA100株に対する評価を行う。2-AAFと2-AAFとは、代謝酵素を持つ試験のために、陽性コントロールとして使用され、さもなくば、ナトリウム アジ化物が、特別な陽性コントロールの筋肉として含まれる。

#### アテローム性動脈硬化のカルノシンの効果

高いコレステロール (2%) 時代で育成された雄のニュージーランドホワイトクロスラビットが、コントロール、またはカルノシン処理2%のために無作為に使用され、そして、血管がコレステロールとトリグリセリドとカルノシンとのために被覆される。全ての動物は、一日当たり食料ペレット100 gの給食と、水は自由採取とした。

8週間の処理期間の後、ラビットは、ヘントバルビタール (325 mg/kg) を用いて麻酔し、全ての大動脈を取り除く。首部、胸部、腹部の領域は最初の一対の肋骨の筋膜と腹膜の筋膜の上方0.3 cmあたり最も近い周囲1 cmの大動脈を切ることにより分離する。動脈血管外膜を注意深く切り離し、動脈は、腹膜内膜の表面をさらすように縫じて切断する。大動脈は、48時間、10%のホルマリン緩衝剤の中で処理される。これらの血管の中の脂質ブラークがスー丹Ⅳ (Sudan IV) を用いて染色され、さらに水性媒体 (カイザーズグリセロールセ

ン)との反応において異なる (第1図)。グルコースは、反応性が少なく、DHAが多く、少なくとも15倍の差を示す。その選択性のために我々は以後の測定した多くの研究の中で、トリオースDHAの使用を選択した。

#### 実験例2

#### カルノシンによるウシ血清アルブミンの変成を誘導するジヒドロキシアセトンの防止

ウシ血清アルブミン (50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pHが7.0で、5.0 mg/mL) の生理学上の濃度は、4週齢のあいだ2.3°Cで、25.0 mMのL-カルノシンの存在と不在とにおいて25.0 mMのジヒドロキシアセトンを用い、または、これを用いないでインキュベートされる。実験は無菌の状態下で行われ、イオン強度は全てのバイアル中で同一である。結果を、第1表に示す。

この長期間の実験において、ジヒドロキシアセトンは、グリケートしたアルブミンを有し、アマドリキニの結果として、引き続いて、固体ゲルの形成を誘導する。カルノシンが存在するときはバイアルの中身は液体のままである。

#### 第1表

インキュベーション条件	結果
アルブミン+リン酸緩衝液	無色、液体
アルブミン+ジヒドロキシアセトン	茶色、重いゲル
アルブミン+ジヒドロキシアセトン	薄い茶色、液体

ウシ血清アルブミンの非酵素的なグリコシレーションのジヒドロキシアセトン誘発に関するカルノシンの効果。

#### 実験例3

#### カルノシン及び異なるアミノ酸とグルコースとの反応度の比較

蛋白質とグルコースによる結合の強さやかなり非酵素的なグリコシレーションは、生理学的な濃度から5.0°Cまで温度を引き上げることにより、インピトロで促進される。インピボ及びインピトロのグルコースの主なターゲットは、酸性のアミノ酸リジンとアルギニン (過酸化、蛋白質中の結合のいずれか) である。第1表はカルノシン及び異なるアミノ酸とグルコースとの反応の比較を示す。蛋白質のためのメイラード反応の特異性を示すために、グルコースは、ソルビトール

(赤道元酸)により置換される。グルコースまたはソルビトール(50 mMのリシ酸ナトリウム緩衝剤、pH 7.0の中、250 mM/ml)の500 μlは、18時間、50°Cで、異なるアミノ酸またはカルノシン(500 mM)を用いてインキュベートされる。その結果生じる濃度の400 nmの光吸収が測定される(表2)。カルノシンは、最も早く反応するアミノ酸、L-アラニン又はペーターアラニンの各々よりも、約2倍、または、6倍以上に、より多くのメイラード反応生成物を形成する。少量のメイラード反応の生成物は、カルノシンがソルビトールと反応したときに、多分赤道元酸へのソルビトールの自動酸化のために明白となる。

[以下余白]

### 表2

グルコースはソルビトールとジペプチド又はアミノ酸との間のメイラード反応生成物の400 nmでの吸光度

インキュベーション条件	OD 400 nm
グルコース + PBS	0.175
グルコース + カルノシン	0.455
ソルビトール + PBS	0.000
ソルビトール + カルノシン	0.209
カルノシン + PBS	0.041
グルコース + D,L-アラニン	0.266
ソルビトール + D,L-アラニン	0.008
グルコース + ペーターアラニン	1.240
ソルビトール + ペーターアラニン	0.010
グルコース + L-アルギニン	0.469
ソルビトール + L-アルギニン	0.010
グルコース + L-リジン	1.170
ソルビトール + L-リジン	0.009
グルコース + イミダゾール	0.046
ソルビトール + イミダゾール	0.035

### 実験例4

#### カルノシン、調節するペプチド及びアミノ酸とジヒドロキシアセトンの反応

カルノシン、調節したペプチド及びアミノ酸に対するDHAの反応率を比較する(第3表)時に、カルノシンはリジンよりも速やかに反応し、ジペプチドがグリケーションのためのアミノ基の他のソースに対して競合できることを示唆している。しかしながら、この定義においてリジンはその反応に寄与する2つのアミノ基を有しているのに、タンパク質中ではイブリコン、アミノ基のみが有効に使用される。イブリコンアミノ基の単独のグリケーション割合の比較は、アルファアミノ基を遮断する、N-アルファカルボベンゾキシリーリジン(ゼーリジン

)が用いられる。DHAがゼーリジンのカルノシンの等モル混合物に添加される時、そのジペプチドは遮断アミノ酸よりも速やかに、約10倍の反応をする(第3表)。相対的な反応性は、グルコースが多糖化の場として消費されるときに保持され、その実験は10日間を完全に要する(表示せず)。蛋白質内に合併されたリジン残基によく親和した分子であるAc-Lys-NH<sub>2</sub>Meは、カルノシンとは既にDHAとより遅い反応を示した。ペプチドAc-Lys-His-NH<sub>2</sub>Meは蛋白質中の後先のグリケーションサイトに類似し、カルノシン投與のような両種の作用を示した。ペプチドのペーターアラニル-グリシンはDHAと実質的に反応せず、確固たるグリケーションのためのペプチド中の2つの位点でヒスチジンのための要求時間が優先される(Shilton and Walton, 1991)。D-カルノシン(ペーターアラニル-D-ヒスチジン)が自然出現アイソマーと同じくらい速く反応する間に、より高い相同比、相同カルノシン(ガムマーアミノ-ペプチリル-レーヒスチジン)はゆっくりと反応した。これは、カルノシンに小さな側鎖上の変更(メチレン基の付加)がその反応性を減じていることを示す。それはまた、各種の基によるリジンの変型が反応率に倒して風味のある効果を有していることが明白となる。Ac-Lys-NH<sub>2</sub>Me(遮断アミノとカルボキシル基)がより速やかに反応するに対し、Z-リジンは遮断アミノ酸よりもゆっくりと反応した。

それはまた、避難イミダゾールとサクシニルヒスチジン(アルファアミノ基が遮断された)が、ジペプチドのアミノ基の消失の割合の増大によって示されるようなDHAとカルノシンの反応性を増強することが見出された。これは、アマドリジンの触媒として又はAGE-生成物に向う反応の手順をそれによって変化させる中間の形態との反応のいずれか一方のイミダゾールであることの示唆と一致している(Shilton and Walton, 1991)。

[以下余白]

### 表3

化合物

反応した%

A ペーターアラニル-His-OH	2.6
ペーターアラニル-His-OH	2.6
Ac-Lys-His-NH <sub>2</sub> Me	2.5
Ac-Lys-NH <sub>2</sub> Me	2.1
H-Lys-OH	1.7
ガムマーアミノ-ペプチリル-His-OH	1.5
Z-Lys-OH	3
ペーターアラニル-Gly-OH	2

B ペーターアラニル-His-OH+ヒスチニル-His  
ペーターアラニル-His-OH+イミダゾール

3.3

4.3

ペプチドのグリケーションとDHAによるアミノ酸酸化。

AとB: 化合物は50°Cで5時間のあいだPBS中でDHAと反応させ、遮断アミノ基の損失をHPLCによって定量した。データはDHAと反応したアミノ基のパーセントとして表現した(インキュベーション混合物中の全ペプチド又はアミノ酸のSEM ± 1%)。日本製: サクシニル-Hisとイミダゾールはペーターアラニル-His-OHと定義した後のアミノ基に等モル濃度で添加した。

### 実験例5

#### グリケート化アミノ酸とグリケート化カルノシンの実質属性の特性

リジンとアルギニンのようなグリケート化アミノ酸(glycated amino acids)は、Karon and Aaes (1983) "エムス試験"によって最初に開示された分析システ

ムにおいて変異原性のあること (Itoら, 1991) が報告されている。他のプロリシとシスティンのようなグリケート化アミノ酸は変異原性が示されていない。我々はL-カルノシンの変異原性を調査し、またL-カルノシン、L-リジン及びL-アラニンからグリケート化している (第4表)。4つの化合物の全ては、特に250 μM投与で、何等かの指示株の抑制が食られた。我々のデータでは、グリケート化されたL-リジンが変異原性であり、それによって変異性があるであろうという、Itoら (1991) による前の結果と一致する。その活性は、ラット肝のS-9代謝活性化システムによってわずかに増加する。グリケート化されたL-アラニンは以前の報告では弱い変異原性であり、我々の実験においては変異原性でないことを示した。通常カルノシンとグリケート化されたカルノシンの両方は変異原性ではなかった。これは、インビボのメイラード反応において意味のある役割をカルノシンが果たすであろうことが予測されるであろう。L-カルノシンとL-リジンのグリケート化の形態の差異の理由は知られていない。

〔以下余白〕

第4表

化合物	TA 100 によるプレート毎の復帰率		
	投与 (μM)	S-9なし	S-9あり
L-カルノシン	250	158 ± 11	149 ± 13
	50	154 ± 14	179 ± 15
グリケート化された	250	142 ± 17	158 ± 19
	50	159 ± 7	167 ± 10
L-カルノシン	250	277 ± 21	244 ± 13
	50	357 ± 17	553 ± 19
グリケート化された	250	145 ± 6	146 ± 9
	50	160 ± 9	181 ± 10
陰性コントロール			
	+ AJD	>1000	N/A
	+ ZAF	N/A	250 ± 33
	+ ZAAF	N/A	500

## グリケート化された化合物の変異原性ボテンシャル

サルモネラ タイフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) TA 100 は、his-Gからhis-Eへの突然変異系の指示株である。データはプレート毎の復帰率

標的の平均値と、ラット肝のミクロソーム的な (S-9) 調製物によって代謝性剤液の有るものと無いものそれらの試験溶媒とコントロールのための標準偏差とを表現した。

第5表

## 直接的なグリコシレーショングリケーションによる抑制としてのアミノグアニジンとカルノシンとの比較

ウシ血清アルブミン (BSA) とオボアルブミンのグリケーションに関するカルノシンとアミノグアニジンの両方の効果の比較は、DNAの一定量と、抗グリケーターのいずれかについて濃度を変えたものとを 60 °C でインキュベートしてなされた。反応の出発時点と 7 時間経過後の一定部分を取り、反応物の質例はスペロース G (Sporose G) カラムによるゲルろ過によって分析した。蛋白質の架橋化とフラグメント状態は、コントロールとして使用した未処理の蛋白質と比較した保持時間中の変化として目に見えて明確となる。幾つかの化合物は、最も小さな化合物のために理論上の保持時間の後に現われた。それらは高いイオン濃度と溶解性 (ツィーン 20) の存在で一様なカラム研磨で妨害される傾向がある。それらは小さな化合物の必要性ではなく、むしろ高い充填度と反応性である。第 5 表にそのデータを要約する。2 つの化合物はこのシステムにおいて別々に反応するとと思われる: カルノシンは高分子量の化合物の形成が同じられ、アミノグアニジンに比べて高い濃度で実質的に多くの効果がある。反応生成物が特徴付けられない全てのアミノグアニジン試料は高濃度で便性に形成される (低分子量の形態 "LMW" として記載され、何故ならばその保持時間は他の全ての化合物での既測より長い)。アルブミンモノマーのピーク面積が減じられることから、これらはオボアルブミン、アミノグアニジンと DHA の間の反応生成物であろう。3 つの化合物の全ては、保持時間又はピーク面積が 7 時間のあいだほぼの条件のもとで別々にインキュベートされる時に変化しないことが示された。LMW はまた、オボアルブミンがインキュベーション混合物中のウシ血清アルブミンによって取替えられる時に観察される (表記せず)。その LMW はカルノシン試料中に少しも存在していない。

第5表

時間	オボアルブミン		
	CroMatogram の面積パーセント	H MW	L MW
<b>0 時</b>			
カルノシン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
<b>アミノグアニジン試料</b>			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
<b>7 時間後</b>			
カルノシン試料			
[A]	9	91	0
[B]	6	94	0
[C]	1	97	0
[D]	25	75	0
[コントロール]	68	32	0
<b>アミノグアニジン試料</b>			
[A]	0	31	69
[B]	8	20	72
[C]	0	41	49
[D]	38	40	22
[コントロール]	68	32	0

## 特表平7-500580 (8)

凡例：オボアルブミンは、カルノシン又はアミノグアニジンのいずれか一方が各濃度で存在する中で7時間のあいだDHAと一緒にインキュベートした。反応生成物はゲルろ過カラム（スパロース6）で分離し、ピークは保持時間に従って分離した：HMW、高分子量（15-30分）；アルブミンモノマー（35分）；及び重て洗出する化合物LMW、低分子量（>40分）。カルノシンとアミノグアニジン濃度は【コントロール】0 mM、【A】600 mM、【B】300 mM、【C】100 mM、【D】50 mM。

抗-グリケーターの有効性のために高い尺度は、反応の7時間後に残存する未反応のアルブミンの量である。この点でカルノシンはアミノグアニジンと比べ全ての濃度でより有効であった。

### 実験例7

#### アテローム性硬化症におけるカルノシンの効果

冠状動脈心臓疾患は糖尿病及び同様に非糖尿病の最も多い死因の1つである。グリケーションはアテローム性plaques（atherosclerotic plaques）に加え、糖尿病性腎炎や目の疾患を含む多くの糖尿病合併症の発現を包含している。コレステロール脂質ウツギは8週間の期間を超えてアテローム性plaquesに関するカルノシンの効果を試験に使用した。我々の研究では、カルノシンによりグリケーションの抑制がplaques形成を防ぐことができる事を示している。これらの結果は第2回に示される。

そのデータのための2つのテールPはマン-ホワイトニー（Mann-Whitney）の2サンプル試験を用いて算出した：腹部大動脈 = 0.0529；腹部大動脈 = 0.5368；大動脈弓 = 0.6623。全てのデータはアミノグアニジン（n=11）治療に対して糖尿病コントロール（n=12）。その他の動物は統計的に良い結果を与えるこの研究において使用した。しかしながら、これらは非酵素的グリコシル化の抑制の両方がplaques形成を減じ得ることを明確に示す。

その最初の結果は8週間の処理期間を超えて減少し、しかしながらコントロールとカルノシン投与群の間で差はなかった。

コントロールに対するカルノシン投与において既報された各種器官の重量に差はなかった。

	体重 kg	
	0週	8週
コントロール	3.27 ± 0.09	2.75 ± 0.17
カルノシン	3.33 ± 0.09	2.68 ± 0.12

8週治療後の器官の重量 (g)			
	肝臓	腎臓	心臓
コントロール	135.94 ± 5.06	16.20 ± 0.67	7.92 ± 0.53
カルノシン	124.10 ± 5.36	17.53 ± 0.69	6.12 ± 0.27

### 実験例8

#### 糖尿病ラットにおける白内障の形成に対するカルノシンの効果

白内障は十分な活力が損なわれる眼球レンズの混濁である。糖尿病は、白内障の原因の1つの形態が糖尿病であるということが多くの年月と多くの臨床実験で支持されるという歴史により糖尿病と関連付けられている。動物中の糖尿病はストレプトゾチジン（streptozotocin）によって誘発させることができ、レンズの混濁は注射20日後より遅延的に発生するが、遅い混濁は注射時の年齢によって約100日後に出現した。

レンズの蛋白質を含んだ蛋白質への糖質の白内障内転は、確認され、定義されている。最も多數の組織では糖尿病において一様な後期のメイラード生成物の少しの蓄積があるが、レンズは中の蛋白質は早期のグリケーション生成物の蓄積ばかりではなく、黄色のメイラード生成物に変化するそれらの時間を有する。化学的変性物と酵素の構造変化説明物の各種を生じる糖質の最初の変化は、蛋白質とレンズの結晶体とそれら各々の絆縫が損傷を生じ得る。糖質の反応性アルdehydesを補足可能なそのものとカルノシンに類似する化合物とは白内障の開始を減少

### 実験例9

#### 糖尿病ラットにおける蛋白質、グリケート化したヘモグロビンと血中グルコースレベルに関するカルノシンの効果

8週で有意の変化のないことが次のパラメーターについて既報された。

	アルブミン尿	
通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
2.4 x / + 1.3	2.51 x / + 1.07	2.51 x / + 1.48

	グリケート化したヘモグロビン (HbA1c) パーセント	
通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
1.5 ± 0.1	4.83 ± 0.23	4.49 ± 0.14

	血中グルコース (mM 値 + SEM)	
通常	糖尿病	糖尿病+カルノシン
10.0 ± 1.5	29.84 ± 4.88	22.63 ± 3.00

蛋白質と網膜疾患における変化は糖尿病条件の約30週後に唯一既報することができる。そのアミノグアニジン化合物、非酵素的グリコシレーションの防止のための有効な使用は、給料30週後の一日の糖尿病モデルにおいてグリケート化したヘモグロビンの量が減少することはない。この研究は現在継続している。

明白に示されたような光明の葉又は葉面から透視することなく、視神経の実験性疾患において示したような本発明により各種の変更及び/又は変形が形成されるであろうことは当業者においては明らかとなるであろう。本発明の実験結果は、それ故、暗示としての全ての関係において考慮されるものであり、それに限定されるものではない。

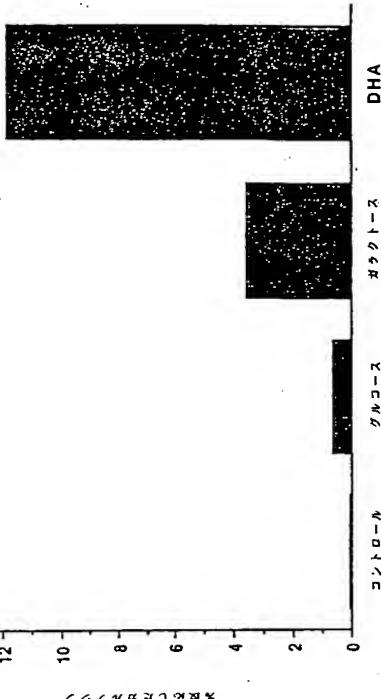
### 〔以下余白〕

### 〔以下余白〕

## 文献:

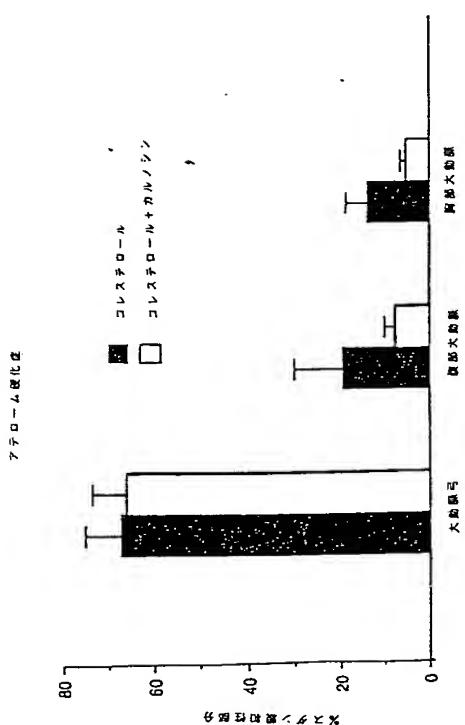
- Gulevitsch, W., とAmiradzibi, S. (1900) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 1902-1903
- Maillard, L.C. (1912) C.R. Acad. Sci. 154, 66-68
- Shilton, B.R., とWalton, D.J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 5587-5592
- Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Brownlee (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 11555-11558
- Kim, S.B., Kim, I.S., Yeo, D.M. と Park, Y.H. (1991) Nut. Res. 254, 55-59
- Haron, D.M. と Ames, B.N. (1983) Nut. Res. 113, 173-215
- Babizhayev, M.A. (1989) Biochimica et Biophysica Acta 1004, 363-371

〔以下省略〕

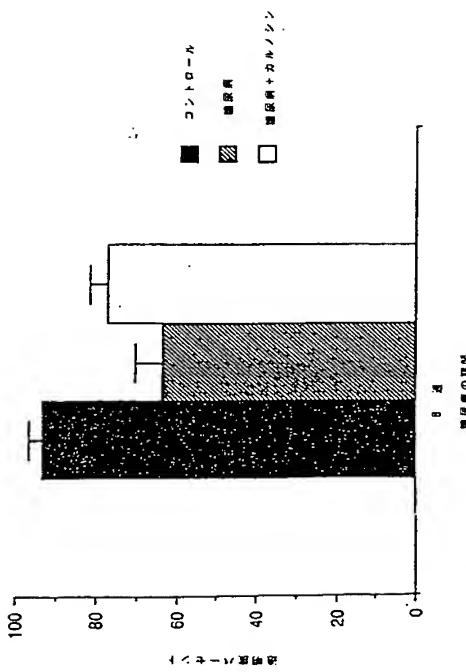


第1図

## カルボニルと蛋白質の反応



第2図



第3図

## 国際調査報告

International application No.  
PCT/AU92/00400

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
Int. Cl. 5 A61K 37/02	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC	
<b>B. FILES SEARCHED</b>	
Machine-readable documents searched (information system informed by classification systems) (IPC: A61K 37/02)	
Document types searched other than machine documents in the artfield that may documents are included in the fields searched AU: IPC as above	
Documents not been recorded during the International search (names of document, and where practicable, certain terms used) DERWENT: CHEM ABSTRACTS AND WPIAT DATABASES USPTO THE KEYWORDS: CAUJONINE, HOMO CARNOVITINE, ANSERINE, HOMO ANSERINE, OPHIDONE, CARCOTIME AND DIABETES	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category*	Classification of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages Reference to Claim No.
X ✓	EP-A133564 (ZELIA PHARMACEUTICAL CO., LTD. AND KAMARI CHEMICALS, LTD.), 3 May 1989 (03.05.89) page 2 lines 11-16, page 7 lines 2-4 12-13, 18-21
X ✓	EP-A303380 (KAMARI YAKURIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 12 February 1989 (13.02.89) page 2 lines 41-49, and the claims 12-13, 18-21
X ✓	US-A-4717716 (KONISHIRO NAGAI AND TAIKO SUDA), 5 January 1988 (05.01.88) columns 8 lines 39-42, columns 9-10 lines 2-4, and the claims 12-13, 18-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of this list. <input checked="" type="checkbox"/> See parent family name.	
<b>* Special categories of cited documents:</b> "A" denotes documents which are prior art which is relevant for the grant of a patent or for the examination of a patent application. "B" denotes documents which are prior art which is relevant for the examination of a patent application but need not be considered for the grant of a patent. "C" denotes documents which are prior art which is relevant for the grant of a patent or for the examination of a patent application but need not be considered for the examination of a patent application. "D" denotes documents which are prior art which is relevant for the grant of a patent or for the examination of a patent application but need not be considered for the examination of a patent application. "E" denotes documents which are prior art which is relevant for the grant of a patent or for the examination of a patent application but need not be considered for the examination of a patent application. "F" denotes documents which are prior art which is relevant for the grant of a patent or for the examination of a patent application but need not be considered for the examination of a patent application. "G" denotes documents which are prior art which is relevant for the grant of a patent or for the examination of a patent application but need not be considered for the examination of a patent application.	
Date of the initial completion of the international search 15 December 1992 (15.12.92)	
Date of sending of the International search report <b>24 DEC 1992 (24.12.92)</b>	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WYNDHAM ST 2605 AUSTRALIA Telephone No. (08) 2322389	
Authorized officer <i>[Signature]</i> TAMARA NYENKE Telephone No. (08) 2322389	

Form PCT/ISA/210 (continuation of form sheet 028 Only 1992) COPIUM

C/CONTINUATION		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Reference to Claim No.
Category*	Classification of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages		
X ✓	US-A-4308718 (KUNIYOSHIRO NAGAI AND KIMUKO NAGAI), 2 April 1985 (02.04.85) columns 7 lines 20-44, column 8, columns 7-11		12-13, 18-21
X ✓	WO-A-9006102 (PEPTIDE TECHNOLOGY LIMITED), 14 June 1990 (14.06.90) page 3 lines 11-21		12-13, 18-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex sheet 028 Only 1992) COPIUM

## 国際調査報告

International application No.  
PCT/AU92/00400

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
WO	9008102	AU	4320299	EP	436411		
EP	313654	JP	63014728	US	4927817	WO	8800048
US	4717716	CH	666118	DE	3540632	DK	5005183
		FR	2577138	GB	2170707	JP	61194322
		NL	8600112	SE	150121		
EP	303380	JP	1042471	US	4981944		
US	4308718						

END OF ANNEX

Form PCT/ISA/210 (patent family annex sheet 028 Only 1992) COPIUM

フロントページの続き

(72)発明者 ヒップキッス、アラン ロジャー  
イギリス国 SE12 0UF ロンドン  
リー ゲイブルズ クローズ 83

(72)発明者 パナジオトパウロス、シアンナ  
オーストラリア国 3108 ヴィクトリア  
ドンキャスター ライアル コート 2